

Ubrzana ekstrakcija otapalom: Primjena u ekstrakciji fenolnih spojeva iz bobičastog voća

Accelerated solvent extraction: Application in the extraction of phenolic compounds from berries

Petra Brzović, Ivana Generalić Mekinić

SAŽETAK

S ciljem zaštite i smanjenja negativnog ljudskog utjecaja na okoliš u modernoj znanosti se sve veća pozornost posvećuje razvoju *zelenih* ekstrakcijskih procesa. Tehnike koje se u tu svrhu koriste doprinose očuvanju sirovina, energije, ali i smanjenju potrošnje otapala uz povećanje prinosa željenih analita. Posebno se ističe ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *Accelerated solvent extraction, ASE* ili *Pressurized liquid extraction, PLE*), koju karakterizira i kratko vrijeme ekstrakcije u zatvorenim komorama pri visokim temperaturama. Bobičasto voće je poznato po svome pozitivnom utjecaju na ljudsko zdravlje, zahvaljujući obilju biološki aktivnih spojeva između kojih se posebice ističu fenolni spojevi. Cilj ovog rada bio je prikazati pregled dosadašnjih novijih istraživanja u području ekstrakcije fenola iz različitog bobičastog voća (aronija, bazga, borovnica, crni i crveni ribiz, kupina) primjenom PLE pri različitim uvjetima ekstrakcije (izbor otapala, vrijeme, temperatura). Svrha je bila i procijeniti učinkovitost PLE u izolaciji ciljanih analita u usporedbi s ostalim *zelenim* i konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama.

Ključne riječi: antocijani, bobičasto voće, fenoli, PLE, zelena ekstrakcija

ABSTRACT

With the aim of protecting and reducing the negative impact of humans on the environment, modern science is increasingly focusing on the development of green extraction processes. The techniques used for this purpose contribute to the conservation of raw materials and energy, but also to the reduction of solvent consumption while increasing the yield of the desired analytes. Accelerated solvent extraction, ASE or Pressurized Liquid Extraction, PLE, stands out here, which is characterized by a short extraction time in closed cells at high temperatures. Berries are known for their beneficial effects on human health,

thanks to the abundance of biologically active compounds, among which phenolic compounds stand out in particular. The aim of this paper was to present an overview of recent research in the field of phenolic extraction from various berries (chokeberry, elderberry, blueberry, black and red currant, blackberry) using PLE under different extraction conditions (choice of solvent, time, temperature). The aim was also to evaluate the effectiveness of this technique in isolating the target analytes in comparison to other green and conventional extraction techniques.

Keywords: anthocyanins, berries, phenolics, PLE, green extraction

UVOD

Posljednjih godina znanstvena istraživanja su sve više usmjerena na problematiku zaštite okoliša i smanjenje negativnog utjecaja ljudske aktivnosti na isti. Navedeno uključuje i težnju za izbjegavanjem štetnih procesa i sintetskih kemijskih spojeva u različitim granama industrije što je dovelo do razvoja koncepta *zelene* kemije. Zelena kemija je održivi pristup koji obuhvaća postupke istraživanja, razvoja i primjene procesa i proizvoda koje karakterizira redukcija ili eliminacija tvari koje imaju negativan učinak na zdravlje i/ili okoliš. Obzirom na prekomjerno trošenje resursa, posebno onih neobnovljivih, znanstvenici su razvili koncept sa 12 principa, među kojima su redukcija potrošnje reagensa i materijala, kraće vrijeme trajanja procesa, bolja energetska učinkovitost i iskorištenje, poticanje direktnih i *in situ* analiza, osiguravanje sigurnosnih operatora i dr. Primjena navedenih principa na učestalo korištene procese i tehnike minimalizira njihov štetni utjecaj na okoliš i time štiti prirodne resurse, što su i glavni ciljevi *zelene* kemije. Kod razvoja *zelenog* procesa, ključan korak predstavlja priprema uzorka. Posebna pažnja u razvoju *zelenih* procesa posvećena je ekstrakcijskim tehnikama, osobito u svrhu smanjenja potrošnje sirovina, otapala, energije, vremena i količine nastalih nepoželjnih nusprodukata (Richter i sur., 1996.; Anastas i Warner, 1998.; Chemat i sur., 2012.; Gałuszka i sur., 2013.; Armenta, 2019.).

Sa stajališta *zelene* kemije, postoji nekoliko značajnih ekstrakcijskih tehnika, od kojih su najučestalije ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcija superkritičnim otapalima (engl. *Supercritical fluid extraction*, SFE) te ubrzana ekstrakcija otapalima (engl. *Accelerated solvent extraction*, ASE ili *Pressurised liquid extraction*, PLE) (Armenta i sur., 2019., Picot Allain i sur., 2021.). Između navedenih tehnika, posebno se ističu MAE i PLE kod kojih se ekstrakcija vrši u zatvorenim sustavima pri visokim tlakovima i temperaturama, te obično u znatno kraćem vremenu u usporedbi s ostalim tehnikama. Obje

tehnike se temelje na smanjenom korištenju uzoraka i otapala i povećanju iskorištenja ciljanih analita, dok im je energetska potrošnja veća (Anastas i Warner, 1996.; Picot Allain i sur., 2021.).

Ubrzana ekstrakcija otapalom (PLE)

PLE je automatizirana ekstrakcijska tehnika kod koje primijenjeni visoki tlakovi održavaju organska otapala u blizini njihovih superkritičnih točaka, odnosno u tekućem stanju, unatoč primjeni visokih temperatura. Korištenjem takozvanih subkritičnih otapala, smanjuje se njihova površinska napetost i viskoznost, što dovodi do lakšeg ulaska otapala u pore matriksa i boljeg otapanja analita. Povišenje temperature povećava i brzinu difuzije, što dovodi do toga da se analiti brže kreću s graničnog sloja matriksa iz kojeg se ekstrahiraju prema otapalu. Navedenim se ujedno i skraćuje vrijeme ekstrakcije te smanjuje količina utrošenog otapala. Primjena PLE olakšava i pucanje slabih intermolekulskih sila (dipol-dipol, van der Waalsove sile, vodikove veze i dr.). Visoki tlakovi dovode do propuštanja zraka koji se nalazi u vakuolama stanica, što uzrokuje denaturaciju membranskih proteina i time lakši pristup otapala analitu. Primjena visokih tlakova omogućava i učinkovitiju ekstrakciju termolabilnih spojeva (Anastas i Warner, 1996.; Picot Allain i sur., 2021.).

Bobičasto voće kao izvor bioaktivnih fenolnih spojeva

U posljednje vrijeme, bobičasto voće sve više dobiva na popularnosti, zahvaljujući dokazanom pozitivnom utjecaju na ljudsko zdravlje. Ove vrste voća su izvrstan izvor sekundarnih biljnih metabolita, od kojih se posebno ističu fenolni spojevi (osobito antocijani i fenolne kiseline) (Chemat i sur., 2012.). Antocijani su poznati prvenstveno po svome superiornom antioksidacijskom učinku, koji se temelji na dva mehanizma. Prvi, direktni, zasniva se na elektron-donorskom potencijalu flavonoidnih struktura, a drugi, indirektni, na povećanju i obnavljanju koncentracije staničnih antioksidanasa (antioksidativnih enzima) (Fernandes i sur., 2014.; Qi i sur., 2023., Patra i sur., 2022.). Osim antioksidacijske aktivnosti, antocijani su poznati i po svome antiupalnom učinku (Szymanowska i Baraniak, 2019.; Qi i sur., 2023.; Xue i sur., 2023.; Winter i sur., 2018.), antimikrobnoj aktivnosti, posebno prema Gram-negativnim vrstama (Puupponen-Pimiä i sur., 2001.; Côté i sur., 2011.; Pojer i sur., 2013.; Tena i sur., 2020.), antikancerogenoj aktivnosti (Malik i sur., 2003.; Faria i sur., 2010.; Tena i sur., 2020.), itd. Osim navedenog, antocijani pokazuju i dobre učinke na zdravlje očiju, sprječavanje kardiovaskularnih bolesti, zaštitu

kognitivnih funkcija, probavni sustav i crijevnu mikrofloru te smanjenje rizika od pretilosti i bolesti povezanih s pretilošću, primjerice dijabetes tipa II (Chemat i sur., 2012.; Gałuszka i sur., 2013.; Tena i sur., 2020.).

PLE u izolaciji fenola bobičastog voća

Obzirom na zastupljenost bobičastog voća u istraživanjima izolacije fenolnih spojeva tehnikom ubrzane ekstrakcije otapalom, u ovome preglednome radu (Tablica 1.) su prikazani dostupni objavljeni literaturni podaci znanstvenih istraživanja (radovi od 2010. godine pronađeni pregledom znanstvenih publikacija pretraživanjem baza ScienceDirect i Scopus putem ključnih riječi), koja su kao predmet imali ekstrakciju fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida i antocijana) iz bobičastog voća ubrzanom ekstrakcijom otapalom primjenom Dionex ASE uređaja (Dionex ASE 350, Thermo Fischer, Waltham, MA, SAD), u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije. Zbog lakše usporedbe dobivenih rezultata istaknuti su osnovni čimbenici ekstrakcije (otapalo, temperatura, vrijeme zagrijavanja komore, primijenjen tlak, statičko vrijeme, volumen ispiranja komore, trajanje faze ispiranja, volumen komore i količina analita) kao i svi poznati uvjeti ostalih provedenih ekstrakcijskih tehnika.

Prema dostupnoj literaturi, PLE predstavlja popularnu tehniku ekstrakcije fenolnih spojeva iz bobičastog voća, što se može pripisati njenoj jednostavnosti, brzini i ekonomičnosti, te činjenici da, zahvaljujući radu u inertnoj atmosferi, ciljani analiti se značajno ne degradiraju unatoč primjeni visokih temperatura i tlakova. Međutim, u svrhu usporedbe ove tehnike s drugim ekstrakcijskim tehnikama (klasičnim i ostalim zelenim tehnikama), izdvojeni su samo primjeri kod kojih je navedena usporedba moguća. Također, iz prikazanih rezultata je vidljivo da iako su uvjeti ekstrakcije uglavnom slični, kao i metode određivanja izoliranih spojeva, usporedba rezultata je otežana zbog različitih načina izražavanja dobivenih podataka. Što se ekstrakcijskog otapala tiče, u PLE ekstrakcijama, najučestaliji su etanol i metanol u različitim omjerima i pri različitim pH vrijednostima, dok su u samo nekoliko istraživanja korišteni heksan, diklormetan (za odmašćivanje) (Ho i sur., 2017.a; 2017.b), aceton (Čulina i sur., 2021.), te voda kod čije uporabe govorimo o subkritičnoj vodenoj ekstrakciji (*subcritical water extraction*, SWE) (Yang i sur., 2017.; Kang i sur., 2021.).

Jedno od možda najopsežnijih istraživanja primjene PLE u izolaciji fenolnih spojeva iz bobičastog voća je ono od strane Ho i sur. (2017.b) koji su ispitivali fenolni sastav ekstrakata četrnaest različitih vrsta bobica nativnih nordijskom području pri čemu je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 80 %-tni metanol. Najviši udio ukupnih fenola (85 mg GAE/g) pronađen je u ekstraktu crne mahunice, a najniži (10 mg GAE/g) u ekstraktu crvenog ribiza.

Tablica 1. Istraživanja o primjeni ubrzane ekstrakcije otapalom u ekstrakciji fenolnih spojeva iz bobičastog voća

Table 1 Research on the application of accelerated solvent extraction in the extraction of phenolic compounds from berries

Bobičasto voće Berries	Predobrada uzorka Sample pretreatment	Ekstrakcijska tehnika Extraction technique	Otapalo Solvent	Uvjeti Conditions	Udio fenolnih spojeva The proportion of phenolic compounds	Referenca Reference
Aronija (<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 64,0 mg GAE/g ekstrakta (0,835 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b
	Liofilizacija	PLE (SWE)	H ₂ O, H ₂ O s 1 % limunske kiseline	190 °C, bez zagrijavanja prije uvođenja komore, tlak 100 bara/1450 psi, statičko vrijeme: 1 min, v. komore 22 mL, uzorak:DZ, 1:2	UA: 0,7 mg/g svježeg uzorka (H ₂ O), 2,5 mg/g svježeg uzorka (H ₂ O s 1 % limunske kiseline)	Kang i sur., 2021
	Liofilizacija	KE	H ₂ O	1 g uzorka + 22 mL otapala, vodena kupelj pri 60 °C tijekom 1 h	UA: 0,49 mg/g svježeg uzorka	Kang i sur., 2021
	Liofilizacija	PLE	96 % EtOH	1,5 g uzorka, 60 °C, 10 MPa, statičko vrijeme: 15 min, broj ciklusa: 2.	UF: 31,95 mg GAE/g ekstrakta	Krakowska - Sieprawska i sur., 2024
	Sušenje (pri 60 °C tijekom 24 h)	Maceracija	60 % EtOH	5 g uzorka, omjer uzorak: otapalo = 1:10, 2 h, 22 °C, miješanje	UF: 57,8 mg GAE/g ekstrakta	Medvedova i sur., 2023
	Sušenje (pri 60 °C tijekom 24 h)	Soxhlet	80 % EtOH	5 g uzorka, 2 h, 78-83 °C	UF: 60,9 mg GAE/g ekstrakta	Medvedova i sur., 2023
	Sušenje (pri 60 °C tijekom 24 h)	PLE	40/96 % EtOH	140 °C, 30 min, 10,3 MPa	UF: 67,9 mg GAE/g ekstrakta (40 % EtOH), ~54 mg GAE/g ekstrakta (96 % EtOH)	Medvedova i sur., 2023
Bazga (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 53,0 mg GAE/g ekstrakta (0,251 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b
	Liofilizacija	PLE	96 % EtOH, 0,5 % TFA u MetOH	70 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 3, ispiranje 60 s, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 55,3 mg GAE/g ekstrakta (96 % EtOH), 49,4 mg GAE/g ekstrakta (0,5 % TFA u MetOH)	Ho i sur., 2017a
	Sušenje (na zraku pri 29 °C u tami)	PLE	100 % EtOH	100/120 °C, 60 bar/870 psi, statičko vrijeme: 10 min, broj ciklusa: 3	FK: 141,52 µg/g (100 °C); 141,82 µg/g (120 °C), FL: 69,68 µg/g (120 °C) FL: 71,87 µg/g uzorka	Oniszczuk i sur., 2019
	Sušenje (na zraku pri 29 °C u tami)	UAE	100 % EtOH	2 g uzorka + 40 mL otapala, pri 40/60 °C, 20 kHz, 100 W	FK: 144,96 µg/g, FL: 69,35 µg/g (40 °C); FK: 148,87 µg/g, FL: 74,54 µg/g uzorka (60 °C)	Oniszczuk i sur., 2019
	Liofilizacija	PLE	96 % EtOH	1,5 g uzorka, 60 °C, 10 MPa, statičko vrijeme: 15 min, broj ciklusa: 2	UF: 30,56 mg GAE/g ekstrakta	Krakowska - Sieprawska i sur., 2024
	Liofilizacija	SFE	Otapalo CO ₂ , kootapalo EtOH	1,5 g uzorka, 60 °C, 200 bara, statičko vrijeme: 30 min, dinamički mode: 30 min, protok 10 mL/min za CO ₂ i 0,4 mL/min za 96 % EtOH	UF: 31,23 mg GAE/g ekstrakta	Krakowska - Sieprawska i sur., 2024

**Petra Brzović i Ivana Generalić Mekinić: Ubrzana ekstrakcija otapalom:
Primjena u ekstrakciji fenolnih spojeva iz bobičastog voća**

Borovnica (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) Borovnica šumska (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 18,0 mg GAE/g ekstrakta (0,211 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b
	Liofilizacija	PLE (SWE)	H ₂ O, H ₂ O s 1 % limunske kiseline	130 °C, bez zagrijavanja prije uvođenja komore, tlak 100 bara/1450 psi, statičko vrijeme: 3 min, v. komore 22 mL, uzorak:DZ, 1:2	UA: 0,5 mg/g svježeg uzorka (H ₂ O), 0,5 mg/g svježeg uzorka (H ₂ O s 1 % limunske kiseline)	Kang i sur., 2021
	Liofilizacija	KE	H ₂ O	1 g uzorka + 22 mL otapala, vodena kupelj pri 60 °C tijekom 1 h	UA: 0,37 mg/g svježeg uzorka	Kang i sur., 2021
	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak: DZ, 4:1	UF: 56,0 mg GAE/g ekstrakta	Ho i sur., 2017b
	Liofilizacija	PLE	MetOH/H ₂ O / octena kiselina (20:75:5) / (80:15:5)	40 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, ispiranje 100 %, broj ciklusa: 3, v. komore 10 mL, 0,2 g uzorka + DZ	UA: 5,8 mg/g svježeg uzorka (20:75:5), 11,1 mg/g svježeg uzorka (80:15:5)	Heffels i sur., 2015
	Liofilizacija	UAE	MetOH/H ₂ O / octena kiselina (20:75:5) / (80:15:5)	1,2 g uzorka + 20 mL otapala, pri 1100 W, 10 min	UA: 1,6 mg/g svježeg uzorka (20:75:5), 5,4 mg/g svježeg uzorka (80:15:5)	Heffels i sur., 2015
Crni ribiz (<i>Ribes nigrum</i> L.)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 50,0 mg GAE/g ekstrakta (0,413 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b
	Vakuumsko sušenje	PLE	30/50/70 % EtOH	80/100 °C, 5 min, 10,34 MPa/1494 psi, statičko vrijeme: 10 min, ispiranje 100 %, broj ciklusa: 2, ispiranje 90 s, v. komore 22 mL, uzorak:DZ, 5:1	UF: 30,6 mg GAE/g (50 % EtOH, 80 °C); UFL: 7,9 mg CE/g (70 % EtOH, 100 °C); UA: 0,7 mg C3GE/g (30 % EtOH, 100 °C)	Milić i sur., 2022
	Vakuumsko sušenje	MAE	30 % EtOH	5 g uzorka + 50 mL otapala, 600 W, 10 min	UF: 34,1 mg GAE/g; UFL: 7,9 mg CE/g; UA: 1,0 mg C3GE/g	Milić i sur., 2022
	Vakuumsko sušenje	UAE	50/70 % EtOH	5 g uzorka + 50 mL otapala, 50/70 °C, 40 kHz, 30 min, 60 W/L	UF: 29,6 mg GAE/g (50 % EtOH, 70 °C) UFL: 8,3 mg CE/g; UA: 0,96 mg C3GE/g (70 % EtOH, 50 °C)	Milić i sur., 2022
Crveni ribiz (<i>Ribes rubrum</i> L.)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 10,0 mg GAE mg GAE/g ekstrakta (0,105 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b
	Vakuumsko sušenje	PLE	50 % EtOH	80/120 °C, 5 min, 10,34 MPa/1494 psi, statičko vrijeme: 10 min, ispiranje 100 %, broj ciklusa: 2, ispiranje 90 s, v. komore 22 mL, uzorak:DZ, 5:1	UF: 26,3 mg GAE/g (80 °C), UFL: 7,7 mg CE/g; UA: 0,09 mg C3GE/g (120 °C)	Milić i sur., 2022
	Vakuumsko sušenje	MAE	30/70 % EtOH	5 g uzorka + 50 mL otapala, 600 W, 10 min	UF: 23,8 mg GAE/g; UFL: 5,6 mg CE/g; UA: 0,1 mg C3GE/g uzorka	Milić i sur., 2022
	Vakuumsko sušenje	UAE	30/50 % EtOH	5 g uzorka + 50 mL otapala, 50 °C, 40 kHz, 30 min, 60 W/L	UF: 20,6 mg GAE/g uzorka, UFL: 5,4 mg CE/g uzorka (50 % EtOH), UA: 0,1 mg C3GE/g uzorka (30 % EtOH)	Milić i sur., 2022

Petra Brzović i Ivana Generalić Mekinić: Ubrzana ekstrakcija otapalom:
Primjena u ekstrakciji fenolnih spojeva iz bobičastog voća

Kupina divlja (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 48,0 mg GAE/g ekstrakta (0,511 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b
Nordijska kupina (<i>Rubus chamaemorus</i> L.)	Liofilizacija	PLE	80 % MetOH	60 °C, 5 min, 1500 psi, statičko vrijeme: 5 min, broj ciklusa: 2, v. komore 100 mL, uzorak:DZ, 4:1	UF: 37,0 mg GAE/g ekstrakta (0,311 mg GAE/g svježeg uzorka)	Ho i sur., 2017b

* PLE - *pressurized liquid extraction* (ubrzana ekstrakcija otapalom), SWE- *subcritical water extraction* (subkritična ekstrakcija vodom), UAE - *ultrasound assisted extraction* (ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija), MAE - *microwave assisted extraction* (mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija), KE- konvencionalna ekstrakcija, SFE - *supercritical fluid extraction* (superkritična fluidna ekstrakcija), EtOH - etanol, MetOH - metanol, H₂O - voda, HAC - octena kiselina, TFA - trifluorocetna kiselina, UF - ukupni fenoli, FL - flavonoidi, UFL - ukupni flavonoidi, FLA - flavanoli, UA – ukupni antocijani, FK - fenolne kiseline, GAE - ekvivalenti galne kiseline, CE - ekvivalenti katehina, QE - ekvivalenti kvercetina, C3G - cijandin-3-O, C3GE – ekvivalenti cijanidin-3-O-glukozida, M3 - malvidin-3-O, M3GE – ekvivalenti malvidin-3-O-glukozida, DZ- dijatomejska zemlja

U istraživanju koje su provodili Kang i sur. (2021.) određivani su optimalni uvjeti PLE na prinos antocijana u ekstraktima aronije i borovnice. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je voda pa je ovo jedan od rijetkih primjera ekstrakcije subkritičnom vodom u dostupnoj literaturi. U ovom istraživanju ispitan je učinak primjene različitih temperatura (110, 130, 150, 170, 190 i 200 °C) i trajanja ekstrakcije (1, 3, 5 i 10 minuta) na učinkovitost ekstrakcije ciljanih spojeva. Istražen je i utjecaj pH vrijednosti ekstrakcijskog otapala na način da je ekstrakcija provedena korištenjem obične i zakiseljene vode (dodatkom 1 % limunske kiseline). Najpovoljniji ekstrakcijski čimbenici za borovnicu su bili pri 130 °C tijekom 3 minute koji su rezultirali sadržajem antocijana od 0,47 mg/g svježeg ploda (koncentracija malvidin-3-galaktozida 0,18 mg/g). Za aroniju su se najboljim pokazali rezultati pri temperaturu 190 °C tijekom 1 minute (antocijani 0,66 mg/g, cijanidin-3-galaktozid 1,34 mg/g). Produljeno vrijeme ekstrakcije kao i povišenje temperature rezultiralo je kod oba uzorka smanjenjem sadržaja navedenih spojeva. Sadržaj antocijana u ekstraktima borovnice pripremljenim običnom i zakiseljenom vodom nisu se značajno razlikovali, dok je kod ekstrakata aronije ta razlika bila jako izražena (u ekstraktu pripremljenom zakiseljenom vodom je pronađen gotovo 3,6 puta viši udio antocijana). Konvencionalna ekstrakcija pri 60 °C je očekivano rezultirala znatno nižim udjelom izoliranih ciljanih spojeva.

U istraživanju Medvedove i sur. (2023.) uspoređeni su ekstrakti aronije pripremljeni maceracijom, Soxhlet ekstrakcijom i PLE tehnikom, kao i utjecaj izbora otapala. Iako se PLE tehnika pokazala znatno učinkovitijom u izolaciji fenolnih spojeva, važno je uočiti da izbor otapala u ovom slučaju 40 %-tnog etanola predstavlja znatno bolji izbor nego li je to 96 %-tni etanol.

Ho i sur. (2017.a) istraživali su udio fenola u ekstraktima bazge pripremljenim korištenjem etanola i zakiseljenog metanola, a rezultati njihova istraživanja su potvrdili ipak nešto viši udio ovih spojeva u etanolnom ekstraktu bazge. Oniszczyk i sur. (2019.) su uspoređivali ekstrakcijsku učinkovitost PLE i UAE pri različitim temperaturama u izolaciji fenolnih kiselina i flavonoida iz bazge. Iako dobiveni rezultati nisu ukazali na statistički značajnije razlike u ekstrakcijskom prinosu ukupnih izoliranih spojeva, može se primijetiti da je kod PLE ekstrakata primjena više temperature (120 °C) rezultirala nižim sadržajem fenolnih kiselina i flavonoida. S druge strane, kod UAE je dokazano suprotno tj. povišenje temperature sa 40 na 60 °C rezultiralo je boljom ekstrakcijom.

Da na udio ekstrahiranih fenolnih spojeva značajno utječe izbor otapala ukazuju Heffels i sur. (2015.) u svojem istraživanju na plodovima iz porodice *Vaccinium* (niskogrmolike borovnice i šumske borovnice). Autori su uspoređivali i učinkovitost PLE u usporedbi s UAE pri čemu su kao otapala koristili 20 i 80 %-tni metanol. Kod obje vrste plodova PLE ekstrakti su rezultirali znatno višim udjelom izoliranih antocijana nego li UAE. Također izbor otapala s višim udjelom metanola pokazao se učinkovitijim. I ovi autori su u oba slučaja koristili zakiseljene sustave otapala. Milić i sur. (2022.) su uspoređivali održive tehnike ekstrakcije u svrhu povećanja prinosa fenolnih spojeva iz crnog i crvenog ribiza pri čemu su kao ekstrakcijsko otapalo koristili etanol (30, 50 i 70 %), a uspoređivane su tri održive, *zelene* ekstrakcijske tehnike (PLE, UAE, MAE) s konvencionalnom ekstrakcijom (KE). Maksimalni prinos fenola u crnom ribizu dobiven je MAE tehnikom (34,1 mg GAE/g) korištenjem 30 %-tnog etanola. Udio fenola u ekstraktu crvenog ribiza bio je niži u MAE ekstraktu nego li u ekstraktu pripremljenom PLE tehnikom korištenjem 50 %-tnog etanola pri 80 °C (26,3 mg GAE/g). Kod crnog ribiza viši udio alkohola u hidroalkoholnoj smjesi koja je korištena za ekstrakciju rezultirao je višim sadržajem flavonoida, dok je viši udio vode znatno učinkovitije djelovao na ekstrakciju ukupnih antocijana (0,7 mg C3GE/g). UAE u usporedbi s PLE je kod korištenja i 50 i 70 %-tnog etanola dala ekstrakte s nižim sadržajem fenola i flavonoida. Iz navedenog je vidljivo da udio izoliranih fenolnih spojeva ovisi o matriksu, primijenjenoj ekstrakcijskoj tehnici i uvjetima ekstrakcije (kao što su udio otapala i temperatura), ali i o ciljanoj vrsti fenolnih spojeva.

ZAKLJUČAK

Zahvaljujući povećanoj svijesti znanstvenika o važnosti zaštite okoliša i očuvanju prirodnih resursa, danas se sve veći naglasak stavlja na korištenje zelenih tehnika i metoda u svim segmentima ljudskog djelovanja. Jedna od takvih tehnika je i ubrzana ekstrakcija otapalom, koja uz navedeno doprinosi i očuvanju analita, uslijed čega se može koristiti na različitim uzorcima u svrhu ekstrakcije različitih bioaktivnih spojeva. Usporedbom podataka iz literature, vidljivo je da je ubrzana ekstrakcija otapalom u većini slučajeva pogodnija ekstrakcijska tehnika od ostalih, često upotrebljivanih tehnika, kao što su konvencionalna ekstrakcija i UAE. Međutim, postoje slučajevi u kojima se PLE nije pokazala najpogodnijom, što je potvrda da navedeni prinos ovisi i o vrsti sirovine i samog ciljanog analita, ali i o ostalim primijenjenim čimbenicima ekstrakcije od kojih se posebno ističe izbor korištenog otapala i primijenjena temperatura ekstrakcije.

LITERATURA

- ANASTAS, P.T., WARNER, J.C. (1998.): *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, Engleska.
- ARMENTA, S., GARRIGUES, S., ESTEVE-TURILLAS, F.A., DE LA GUARDIA, M. (2019.): *Green extraction techniques in green analytical chemistry*. *Trends in Analytical Chemistry*, 116: 248-253.
- CHEMAT, F., VIAN, M.A., CRAVOTTO, G. (2012.): *Green extraction of natural products: concept and principles*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(7): 8615-8627.
- CÔTÉ, J., CAILLET, S., DOYON, G., NG, K. (2011.): *Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts*. *Food Control*. 22: 1413-1418.
- ČULINA, M., CVITKOVIĆ, D., PFEIFER, D., ZORIĆ, Z., REPAJIĆ, M., ELEZ GAROFULIĆ, I., BALBINO, S., PEDISIĆ, S. (2021.). *Phenolic profile and antioxidant capacity of selected medicinal and aromatic plants: Diversity upon plant species and extraction technique*. *Processes*. 9: 2207.
- FARIA, A., PESTANA, D., TEIXEIRA, D., DE FREITAS, V., MATEUS, N., CALHAU, C. (2010.): *Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: Anticancer properties in breast cancer cell lines*. *Phytotherapy Research*. 24: 1862-1869.

- FERNANDES, I., FARIA, A., CALHAU, C., DE FREITAS, V., MATEUS, N. (2014.): Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*. 7: 54-66.
- GALUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z., NAMIEŚNIK, J. (2013.): The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*. 50: 78–84.
- HEFFELS, P., WEBER, F., SCHIEBER, A. (2015.): Influence of accelerated solvent extraction and ultrasound-assisted extraction on the anthocyanin profile of different *Vaccinium* species in the context of statistical models for authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(34): 7532-7538.
- HO, G.T.T., KASE, E.T., WANGENSTEEN, H., BARSETT, H. (2017.a): Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(13): 2677-2685.
- HO, G.T.T., NGUYEN, T.K.Y., KASE, E.T., TADESSE, M., BARSETT, H., WANGENSTEEN, H. (2017.b): Enhanced glucose uptake in human liver cells and inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes by Nordic berry extracts. *Molecules*. 22: 1806.
- KANG, H.J., KO, M.J., CHUNG, M. S. (2021.): Anthocyanin structure and pH dependent extraction characteristics from blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in subcritical water state. *Foods*. 10: 527.
- KRAKOWSKA-SIEPRAWKA, A., WALCZAK-SKIERKA, J., POMASTOWSKI, P., SOBOLEWSKA, R., GŁOGOWSKI, J., BERNAT, C., RAFIŃSKA, K. (2024.): Advanced extraction techniques for bioactive compounds from berry fruits: Enhancing functional food applications. *Foods*. 13(24): 4115.
- MALIK, M., ZHAO, C., SCHOENE, N., GUISTI, M.M., MOYER, M.P., MAGNUSON, B.A. (2003.): Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutrition and Cancer*. 46: 186-196.

- MEDVEĐOVÁ, K., NAHLIKOVÁ, L., STRIŽINCOVÁ, P., DUBAJ, T., KREPS, F. (2023.): Extraction of biologically active compounds from *Aronia melanocarpa*: Comparison of techniques and multiple response optimization. *Acta Chimica Slovaca*. 16(1): 92-98.
- MILIĆ, A., DANIČIĆ, T., TEPIĆ HORECKI, A., ŠUMIĆ, Z., TESLIĆ, N., BURSAĆ KOVAČEVIĆ, D., PUTNIK, P., PAVLIĆ, B. (2022.): Sustainable extractions for maximizing content of antioxidant phytochemicals from black and red currants. *Foods*. 11: 325.
- ONISZCZUK, A., OLECH, M., ONISZCZUK, T., WOJTUNIK-KULESZA, K., WÓJTOWICZ, A. (2019.): Extraction Methods, LC-ESI-MS/MS Analysis of phenolic compounds and antiradical properties of functional food enriched with elderberry flowers or fruits. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(8): 4719-4730.
- PATRA, S., MAKHAL, P.N., JARYAL, S., MORE, N., RAO KAKI, V. (2022.): Anthocyanins: Plant-based flavonoid pigments with diverse biological activities. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*. 2(1): 118-127.
- PICOT ALLAIN, C., MAHOMOODALLY, M.F., AK, G., ZENGIN, G. (2021.): Conventional versus green extraction techniques - a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*. 40: 144-156.
- POJER, E., MATTIVI, F., JOHNSON, D., STOCKLEY, C.S. (2013.): The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 483-508.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NOHYNEK, L., MEIER, C., KÄHKÖNEN, M., HEINONEN, M., HOPIA, A., OKSMAN-CALDENTEY, K.M. (2001.): Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 494-507.
- QI, Q., CHU, M., YU, X., XIE, Y., LI, Y., DU, Y., LIU, X., ZHANG, Z., SHI, J., YAN, N. (2023.): Anthocyanins and proanthocyanidins: Chemical structures, food sources, bioactivities, and product development. *Food Reviews International*. 39(7): 4581-4609.
- RICHTER, B. E., JONES, B.A., EZZELL, J.L., PORTER, N.L., AVDALOVIĆ, N., POHL, C. (1996.): Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*. 68: 1033-1039.

- SZYMANOWSKA, U., BARANIAK, B. (2019.): Antioxidant and potentially anti-inflammatory activity of anthocyanin fractions from pomace obtained from enzymatically treated raspberries. *Antioxidants*. 8: 299.
- TENA, N., MARTÍN, J., ASUERO, A.G. (2020.): State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. *Antioxidants*. 9: 451.
- WINTER, A.N., ROSS, E.K., WILKINS, H.M., STANKIEWICZ, T.R., WALLACE, T., MILLER, K., LINSEMAN, D.A. (2018.): An anthocyanin-enriched extract from strawberries Delays disease onset and extends survival in the hSOD1G93A mice model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nutritional Neuroscience*. 21: 414-426.
- XUE, H., SANG, Y., GAO, Y., ZENG, Y., LIAO, J., TAN, J. (2023.): Research progress on absorption, metabolism, and biological activities of anthocyanins in berries: A review. *Antioxidants*. 12(1): 3.
- YANG, J., OU, X., ZHANG, X., ZHOU, Z., MA, L. (2017.): Effect of different solvents on the measurement of phenolics and the antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) with accelerated solvent extraction. *Journal of Food Science*. 82(3): 605-612.

Adresa autora - Author's address:

Petra Brzović
Kontakt osoba: petra.brzovic@ktf-split.hr
Ivana Generalić Mekinić

Kemijско-tehnološki fakultet,
Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,
Ruđera Boškovića 35,
21000 Split

Primljeno – received:

27.03.2025.

Revidirano - revised:

07.10.2025.

Prihvaćeno – accepted:

14.10.2025.